

## Superexpressão do Gene *Phosphorus Starvation Tolerance 1* de Arroz (*OsPSTOL1*) em Tabaco



# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 143**

## **Superexpressão do Gene *Phosphorus Starvation Tolerance 1* de Arroz (*OsPSTOL1*) em Tabaco**

Patrícia Lages Silva Palhares  
Simara da Silva Lopes  
Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Meire de Cassia Alves  
Jurandir Vieira Magalhães  
Cláudia Teixeira Guimarães  
Andrea Almeida Carneiro  
Sylvia Morais de Sousa

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Patrícia Lages Silva Palhares

**1ª edição**

**Versão Eletrônica (2016)**

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Milho e Sorgo**

Superexpressão do gene *Phosphorus Starvation Tolerance1* de arroz (OsPSTOL1) em tabaco / Patrícia Lages Silva Palhares...

[et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

33 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 143).

1. Genética. 2. Fumo. 3. Fósforo. 4. Sistema radicular. I. Palhares, Patrícia Lages Silva. II. Série.

CDD 576.5 (21. ed.)

© Embrapa 2016

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	10
<b>Resultados e Discussão</b> .....	16
<b>Conclusões</b> .....	27
<b>Agradecimentos</b> .....	27
<b>Referências</b> .....	27

# **Superexpressão do Gene *Phosphorus Starvation Tolerance 1* de Arroz (*OsPSTOL1*) em Tabaco**

---

***Patrícia Lages Silva Palhares<sup>1</sup>***  
***Simara da Silva Lopes<sup>2</sup>***  
***Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>3</sup>***  
***Meire de Cassia Alves<sup>4</sup>***  
***Jurandir Vieira Magalhães<sup>5</sup>***  
***Cláudia Teixeira Guimarães<sup>6</sup>***  
***Andrea Almeida Carneiro<sup>7</sup>***  
***Sylvia Moraes de Sousa<sup>8</sup>***

## **Resumo**

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais limitantes às culturas nos solos brasileiros e com menor eficiência de uso pelas plantas. Nos solos tropicais, a adubação fosfatada é realizada pela adição de altas doses de fosfatos solúveis, uma vez que a maior parte do fósforo adicionado se torna indisponível por causa do processo de fixação, aumentando significativamente os custos de produção. Adicionalmente, esse nutriente não é renovável. Plantas eficientes no uso de P podem aumentar a produtividade nos países tropicais, onde

---

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Sete Lagoas, MG, patriciaapalhares@gmail.com.

<sup>2</sup>Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João de Rei, UFSJ, São João de Rei, MG, simarabrazil@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Químico, Ph.D., Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 357001-970 Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br.

<sup>4</sup>Bióloga, Mestre, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 357001-970 Sete Lagoas, MG, meire.alves@embrapa.br.

<sup>5</sup>Eng.-Agrôn., Ph.D., Pesquisador em Genética da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 357001-970 Sete Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@embrapa.br.

<sup>6</sup>Eng.-Agrôn., Ph.D., Pesquisadora em Genética da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 357001-970 Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br.

<sup>7</sup>Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Celular da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 357001-970 Sete Lagoas, MG, andrea.carneiro@embrapa.br.

<sup>8</sup>Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 357001-970 Sete Lagoas, MG, sylvia.sousa@embrapa.br, autora correspondente.

o P está frequentemente indisponível, e levar a redução da quantidade aplicada de adubos nos países desenvolvidos. Um dos QTLs (locos que controlam a expressão de caracteres quantitativos) de efeito maior da tolerância a deficiência de P, *Pup1*, foi identificado, mas o gene responsável permaneceu desconhecido até que o loco foi sequenciado, mostrando a presença do gene, *PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1* (*PSTOL1*) na variedade tradicional de arroz *Kasalath* (eficiente a P). *OsPSTOL1* é uma proteína quinase que quando se superexpressa aumenta a superfície radicular, a aquisição de P e a produtividade de arroz sob baixo P. Com o objetivo de verificar a função do *OsPSTOL1* de arroz em dicotiledôneas o gene foi clonado abaixo do promotor da ubiquitina no vetor pMCG1005, tendo o gene *BAR* como marcador de seleção. As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana*) foram geneticamente transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA101 e regeneradas dos calos selecionados em meio de enraizamento e parte aérea suplementados com 100 mg/ml de Tioxin e 1 mg/L de Fosfinotricina. Os fragmentos do gene *BAR* (~400 pb) e do gene *OsPSTOL1* (~700 pb) foram amplificados por PCR confirmando a integração de ambos os genes nas plantas transformadas. Diversas plantas apresentaram uma cópia do transgene e aquelas que também tiveram expressão gênica significativa foram selecionadas para os experimentos sob baixo P em condições controladas. A superexpressão do gene *OsPstol1* aumentou significativamente o crescimento vegetativo e a aérea de superfície sob baixo P, indicando que esse gene age em tabaco de maneira similar ao que ocorre em arroz.

**Palavras-chave:** *Nicotiana tabacum*; raiz; eficiência; fósforo.

# Overexpression of Rice *Phosphorus Starvation Tolerance 1* Gene (*OsPSTOL1*) in Tobacco

---

*Patrícia Lages Silva Palhares*<sup>1</sup>  
*Simara da Silva Lopes*<sup>2</sup>  
*Ubiraci Gomes de Paula Lana*<sup>3</sup>  
*Meire de Cassia Alves*<sup>4</sup>  
*Jurandir Vieira Magalhães*<sup>5</sup>  
*Cláudia Teixeira Guimarães*<sup>6</sup>  
*Andrea Almeida Carneiro*<sup>7</sup>  
*Sylvia Moraes de Sousa*<sup>8</sup>

## Abstract

Phosphorus (P) is one of the most limiting macro elements to food crop production. In tropical soils, the P fertilizers are applied in excess, once most of the P becomes unavailable due to fixation, increasing the production costs. Moreover, this is a nonrenewable resource. P-efficient plants could enhance yield in tropical countries where P is frequently unavailable and reduce the need for P fertilizer in the developed world, thereby ameliorating overuse of P. A major QTL (Quantitative Trait Locus) for phosphorus-deficiency tolerance, *Pup1*, was identified but the gene responsible to its functional remained elusive until the locus was sequenced, showing the presence of a *Pup1*-specific gene, which was named *PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1* (*PSTOL1*) in the rice traditional variety *Kasalath* (P-efficient). *OsPSTOL1* is a protein kinase that when over expressed enhances root surface, P acquisition and grain yield in rice under P deficiency. In order to verify the function of rice *OsPSTOL1* in dicot plants the gene was cloned downstream of ubiquitin promoter in pMCG1005 vector, using *BAR* gene as

a selective marker. Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana*) were genetically transformed via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain and regenerated from selected callus in shooting and rooting medium supplemented with 100 mg/ml of Tioxin and 1 mg/L of Phosphinothricin. Fragments of the *BAR* gene (~400 bp) and *OsPSTOL1* gene (~700 bp) were amplified by PCR confirming integration of respective genes in the transformed plants. Several plants presented one copy of the transgene, and those that also showed overexpression of the transgene were selected for evaluation under controlled low P conditions. Overexpression of *Pstol1* gene significantly enhanced vegetative plant growth and root surface area on low P, indicating that this gene acts in a similar manner to *OsPstol1* gene in rice plants.

**Keywords:** *Nicotiana tabacum*; root; efficiency, phosphorus.

## Introdução

O Cerrado ocupa cerca de 22% do território nacional e é o segundo maior bioma brasileiro, com 80 milhões de hectares, sendo 26,5% de sua área ocupada com pastagens cultivadas e 10,5% com culturas agrícolas (SANO et al., 2008). Há algumas décadas, não havia expectativa de desenvolvimento da agricultura nas áreas de cerrado, pois o solo apresentava deficiência de elementos essenciais para as plantas, como o fósforo (P), além de apresentar elevada toxidez por alumínio (Al), limitando o desenvolvimento das plantas (FAGERIA, 2001). Após a década de 1970, as pesquisas nesse bioma se intensificaram e alternativas para deixá-lo agricultável, corrigindo a acidez e utilizando fertilizantes adequados, foram geradas (SANTOS et al., 2010). Desde então há um crescente



aumento no consumo de fertilizantes, sobretudo os fosfatados, nas áreas de cerrado brasileiras e no mundo (VANCE et al., 2003). A adubação fosfatada é realizada pela adição de altas doses de fosfatos solúveis ao solo, sendo que a maior parte do adubo adicionado se torna indisponível por causa do processo de fixação, aumentando significativamente os custos de produção (VANCE; CHIOU, 2011). Além disso, os fertilizantes fosfatados são recursos não renováveis, cujo pico de consumo deve ser atingido no meio deste século (VANCE; CHIOU, 2011).

O fósforo é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento das plantas e é essencial para o seu metabolismo, pois além de participar dos processos de geração de energia, como a fotossíntese e respiração, participa da síntese de ácidos nucleicos, membranas, ativação e inativação de enzimas, reações redox, sinalização, metabolismo de hidratos de carbono e de fixação de nitrogênio (RAGHOTHAMA, 2000; VANCE et al., 2003; NIU et al., 2012; TENG et al., 2013). Estima-se que 5,7 milhões de hectares de terra em todo o mundo são deficientes em P (NIU et al., 2012), e para aumentar a produtividade e a aquisição de P no solo é importante melhorar a genética das plantas cultivadas e combiná-las com práticas de manejo.

A morfologia e a arquitetura radiculares são aspectos importantes para aumentar a absorção de P. Um maior volume e área radicular aumentam a superfície de contato entre a raiz e o P e também aumentam a capacidade de associação com microrganismos da rizosfera, como as micorrizas (RAMAEKERS et al., 2010; LYNCH; BROWN, 2012). Plantas mais eficientes no uso de P têm maior autonomia de crescimento e desenvolvimento em solos com baixa disponibilidade de fosfatados (LYNCH, 2007; VANCE; CHIOU, 2011). A eficiência na

utilização de P pelas plantas é uma característica complexa e ainda pouco conhecida, sendo que a eficiência no uso de P em condições de campo está mais associada com a capacidade da planta em adquirir P do solo, eficiência de aquisição, do que com a sua capacidade em utilizar mais eficientemente o P no interior da planta, eficiência de utilização interna (PARENTONI; SOUZA JÚNIOR, 2008).

Um dos QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de maior efeito na aquisição de P e que afeta a morfologia radicular de plantas de arroz é o *Phosphorus Uptake 1 (Pup1)* que foi identificado em uma variedade tradicional de arroz, *Kasalath* (eficiente na aquisição de P), e que está ausente do genoma de referência *Nipponbare* (ineficiente) (NI et al., 1998; WISSUWA; AE, 2001; WISSUWA et al., 1998). Esse loco responde por cerca de 80% da variabilidade fenotípica para características correlacionadas com absorção de P em arroz (WISSUWA et al., 2002), aumentando a produtividade de duas a quatro vezes sob condições de estresse de P (CHIN et al., 2010). O genoma da variedade *Kasalath* apresentou uma sequência de ~90 kilo pares de bases (Kpb) significativamente diferente da sequência do BAC homólogo presente no genoma referência *Nipponbare* por causa de grandes inserções/deleções (*indels*) (HEUER et al., 2009). Nessa região da variedade *Kasalath* se encontra o gene responsável pelo loco *Pup1*, que é uma proteína do tipo serina/treonina quinase, chamada *OsPSTOL1 (PHOSPHORUS STARVATION TOLERANCE 1)* (GAMUYAO et al., 2012).

A superexpressão constitutiva do *OsPSTOL1* foi feita em duas variedades modernas de arroz, IR64 e *Nipponbare*, que não possuem o gene *OsPSTOL1* originalmente. Os transgênicos que apresentaram alta expressão do transgene mostraram

um aumento da superfície radicular, da absorção de P e um incremento de 60% na produção de grãos (GAMUYAO et al., 2012). Transformações com o gene repórter -glucuronidase (*GUS*) utilizando plantas transgênicas IR64, sob controle do promotor *OsPSTOL1*, mostraram que esse gene é expresso no meristema, onde são formadas as raízes da coroa, principais constituintes do sistema radicular em arroz. No meristema radicular, a expressão de *GUS* foi restrita aos primórdios das raízes da coroa e células do parênquima fora do cilindro vascular periférico, padrão semelhante ao de outros genes envolvidos no desenvolvimento radicular. Esses dados indicam que o gene *PSTOL1* está relacionado com controle do desenvolvimento precoce e do crescimento radicular em arroz (GAMUYAO et al., 2012).

Em razão do potencial de uso do *OsPSTOL1* como regulador na formação do sistema radicular, o objetivo desse trabalho foi verificar se o gene *OsPSTOL1* é capaz de aumentar a superfície radicular em plantas de tabaco transgênicas.

## **Materiais e Métodos**

### **Construção do Cassete de Transformação com o Gene *OsPSTOL 1***

A sequência BAK26566 foi utilizada como molde para a síntese do gene *OsPSTOL1* (GAMUYAO et al., 2012). O gene *OsPSTOL1* foi clonado nos sítios *AvrII* e *SpeI* no vetor binário pMCG1005 pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>). O vetor pMCG1005 tem o promotor ubiquitina e o gene *BAR* como marcador de seleção sob o promotor 4x35S.

## **Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o Gene *OsPSTOL1***

A inserção do cassete de expressão em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 (HOOD et al., 1986) foi feita por eletroporação. O DNA contendo o vetor binário com 35S::*OsPSTOL1*::NOS e 35S::*NOS* (vetor vazio, controle) foi adicionado as células eletrocompetentes e em seguida foi colocado 1,0 mL de meio YEP sem antibiótico e incubado por 2 horas a 28 °C com agitação de 100 rpm sendo, logo após centrifugado e ressuspendido em 200 µL de meio YEP. Foram plaqueados 50 µL da suspensão em meio YEP sólido com os antibióticos canamicina, espectinomicina e clorofenicol. As placas foram incubadas a 28 °C por três dias. Posteriormente foi isolada uma colônia de cada construção gênica e incubada novamente a 28 °C durante 18 horas em meio YEP líquido contendo antibiótico (LIN et al., 1995) para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para confirmação da transformação foi aplicado 1,0 µL do DNA plasmidial em gel de agarose 0,8%.

## **Transformação de Tabaco**

As plântulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana*) foram crescidas in vitro e ao atingir aproximadamente 5 cm de altura foram utilizadas para transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. As culturas de *Agrobacterium* com as construções gênicas foram colocadas em contato com os discos foliares de tabaco em uma placa de Petri, durante 1 minuto. Após agitação, os explantes foram transferidos para meio PSM (*Shooting Medium*), cuja composição em um litro corresponde a 10 mL sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g sacarose, 1 mL vitamina B5, 0,5 mL/estoque 1 mM NAA e 1 mL/estoque 4

mM BA, sem antibiótico e agente de seleção por 48 horas em câmara de crescimento iluminada com temperatura entre 24 e 26 °C. Terminado esse período, os explantes foram novamente transferidos para meio PSM com antibiótico (Tioxin) 100 mg/L por sete dias. Após esse período, foram transferidos para um novo meio PSM + antibiótico + 1 mg/L de PPT (fosfinotricina), esse funcionando como agente seletivo, sendo subcultivado em novos meios, a cada sete dias, até ocorrer diferenciação para calos e posteriormente diferenciação das folhas. Essas plântulas foram isoladas (ao atingir aproximadamente 1 cm de comprimento) e transferidas para o meio de crescimento e enraizamento de plântulas PRM, cuja composição para um litro corresponde a 5 mL sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 15 g sacarose, 1 mL vitamina B5, antibiótico e 1 mg/L de PPT. As plântulas enraizadas foram transferidas para solo em casa de vegetação, em potes de 3 Kg e quando já aclimatadas foram transferidas para vasos de 5 Kg. Uma nova seleção com herbicida PPT (1 mg/ mL) foi feita borrifando a solução nas folhas. As plantas resistentes ao herbicida permaneceram verdes, já aquelas sensíveis apresentaram folhas com aspecto amareladas e morreram.

## **Identificação dos Eventos Transgênicos por PCR**

Para comprovar a inserção dos cassetes de expressão nas plantas transgênicas de tabaco regeneradas foi feita uma reação de PCR com 10 ng/ $\mu$ L de DNA genômico extraído de acordo com Saghai-Marooft et al. (1984), 10  $\mu$ M primer direto, 10  $\mu$ M primer reverso, tampão 10X, 2,5  $\mu$ M dNTP's, 1 U Taq DNA Polimerase Platinum Invitrogen, DMSO 20% e água ultrapura para um volume final de 20  $\mu$ L de reação. O ciclo no termociclador foram 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos

de 94 °C por 20 segundos para desnaturação da dupla fita de DNA, 62 °C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72 °C por 30 segundos para extensão e um ciclo final de extensão de 5 minutos a 72 °C. Para amplificação do DNA genômico foi utilizado um primer direto na região promotora da Ubiquitina (UBI\_127\_F: GTGTTTAGCAAGGGCGAAAA) e um primer reverso na região codificadora do *OsPSTOL1* (p*OsPSTOL1*\_580\_R: TCAGATGGCACAGTTTGCTC ), que gerou um fragmento de 707 pb, e um par de primers para o gene *BAR* (*BAR\_F1*: AGAAACCCACGTCATGCC e *BAR\_R1*: GTGGTTGACGATGGTGCA), que gerou um fragmento de 427 pb.

## Estimativa do Número de Cópias do Transgene por qPCR

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de linhagens T0 de tabaco (SAGHAI-MAROOF et al., 1984) e utilizado na concentração de 20 ng/μL. A estimativa do número de inserções do transgene no genoma de tabaco foi feita por PCR quantitativo conforme Barros et al. (2011) e Zhang et al. (2015) no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando o kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Como referência de cópia única foram usados os primers para o gene *Axi1* (ŠUBR et al., 2006) de tabaco e para o transgene, primers do gene *BAR* (marcador de seleção no cassete de transformação, sequências *BAR-F* 5'ACAGCGACCACGCTCTTGA3' e *BAR-R* 5'GCTCTACACCCACCTGCTGA3'). O evento cópia única de tabaco utilizado como referência para o gene *BAR* foi a amostra

*ZmPSTOL1\_8.02Ev.6*, que apresentou segregação 3:1 em trabalhos anteriores (LOPES, 2016).

As condições da reação foram 2,5 µL de DNA genômico 20 ng/µL, 5 µL do reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,6 µL de cada primer e 1,3 µL de água ultrapura. No termociclador foi realizado um ciclo de 95 °C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

## **Análise de Expressão dos Eventos Transgênicos por qPCR**

As sementes dos eventos transgênicos de tabaco foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 6% por 5 minutos, lavadas com água destilada e germinadas em frascos com meio de cultura MS ½ força e polimerizado com ágar sob baixo P (Sigma, 97 µM de P). Após 57 dias, as plântulas foram coletadas e o RNA foi extraído com o kit Plant RNeasy (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. O tempo de coleta das plântulas de tabaco foi previamente determinado por Lopes (2016). A concentração do RNA foi determinada pela leitura de absorbância a 260, 280 e 320 nm e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2%. A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total, previamente tratados com DNase I, utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, CA).

As análises de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas no equipamento ABI7500 utilizando a metodologia SYBR Green, segundo as recomendações do fabricante. Foi utilizado um par de primers 18S ribossomal SYBR Green

como controle endógeno e primers específicos para os genes *BAR* (*BAR-F*: ACAGCGACCACGCTCTTGA e *BAR-R*: GCTCTACACCCACCTGCTGA) e *OsPSTOL1* (*OsPSTOL1-F*: GTTTGTGGTGCATACAACCTCGT e *OsPSTOL1-R*: GGTTCTCAAAAACAGAAGATG). A reação para o ensaio com *Syber Green* foi composta por 2,5 µL de cDNA, 5 µL do reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1,0µL de cada primer (exceto para primer do gene *Bar*, 0,6µL) e 1,3 µL de água ultrapura. As condições do termociclador foram 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos. A expressão gênica relativa foi calculada conforme o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## Caracterização Morfológica do Sistema Radicular

As sementes de tabaco foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 6% por 5 minutos, lavadas com água destilada e germinadas para posterior transferência para placas de Petri (90 x 15mm) em meio MS ½ sob baixo fósforo (97 µM de P). Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3$  °C, noturna de  $20 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 horas. O sistema radicular das plântulas de tabaco foi escaneado após 57 dias com o escâner Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU), e os dados foram analisados com o software WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas diversas características radiculares, incluindo comprimento radicular total (cm) e comprimento de raízes com diâmetro entre 0,0 e 1,0 mm e entre 1,0 e 4,5 mm (SOUSA et al., 2012).



## Resultados e Discussão

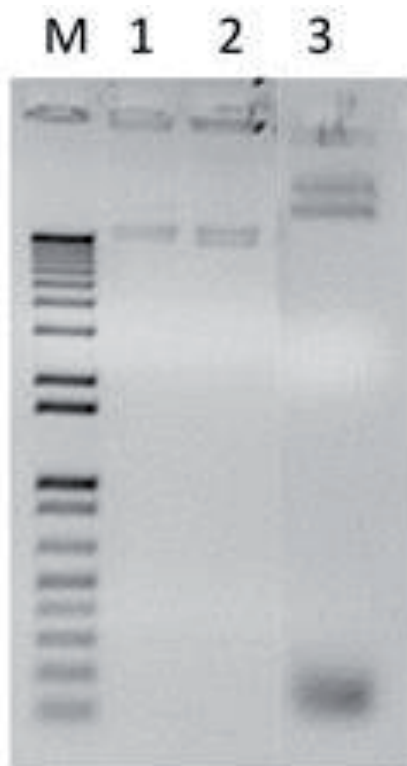
### Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com *OsPSTOL1*

O gene *OsPSTOL1* foi clonado no plasmídeo pMCG1005 pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>) e confirmado por digestão com as enzimas *AvrII* e *SpeI*. Após a confirmação, as construções, com o *OsPSTOL1* e controle (vetor vazio), foram corretamente inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, o que pode ser confirmado observando as bandas na Figura 1. A *Agrobacterium tumefaciens* é ideal para transformação de plantas visando a superexpressão, pois há maiores chances de inserção cópia única do transgene quando comparada a outros métodos (SHA et al., 2004).

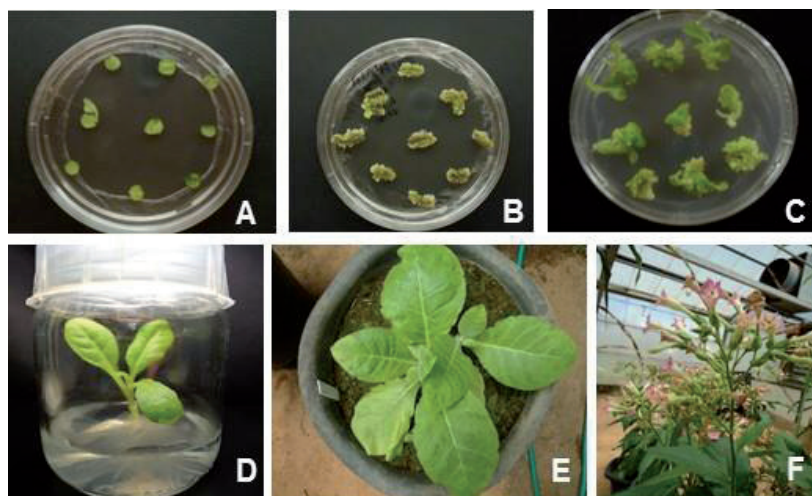
### Transformação de Tabaco com *OsPSTOL1*

Após a inserção dos cassetes de expressão na *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 foi feita a transformação dos discos foliares a partir de plântulas de tabaco cultivadas in vitro (Figura 2A). O tabaco é uma planta muito utilizada para transformação por ser um método simples e robusto além de ter um ciclo de crescimento curto, sendo necessário cerca de dois meses para o enraizamento, quando a planta pode ser transferida para solo (GALLOIS; MARINHO, 1995). O material foi selecionado com herbicida fosfinotricina (PPT) (Figura 2B) a fim de identificar os calos resistentes. O subcultivo dos explantes foi feito até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas (Figura 2C). Posteriormente, as plântulas foram isoladas, transferidas para meio de enraizamento (Figura 2D) e transferidas para vasos com solo em casa de vegetação (Figura 2E), onde

permaneceram até o florescimento (Figura 2F). As plantas foram selecionadas com herbicida PPT em casa de vegetação e as plantas sobreviventes foram testadas quanto a inserção do cassete de expressão e multiplicadas. Foram obtidos eventos transgênicos para a construção com o vetor vazio (pMCG1005) e para a construção UBI::*OsPSTOL1*::NOS.



**Figura 1.** Gel de agarose para visualização da inserção do plasmídeo em *A. tumefaciens*. M – Marcador molecular 1 Kb Ladder (Invitrogen); 1 - *OsPSTOL1* colônia 1; 2 - *OsPSTOL1* colônia 2; 3 - pMCG1005 vazio.



**Figura 2.** Processo de transformação de tabaco. A) Discos de folha de tabaco no meio MS sólido com *Agrobacterium tumefaciens*; B) Diferenciação dos calos no meio de seleção (fosfinotricina – 1.0  $\mu$ M PPT); C) Desenvolvimento da parte aérea sob seleção; D) Plântula de tabaco enraizando in vitro; E) Planta de tabaco em pote com solo na casa de vegetação e F) Tabaco transgênico florescendo na casa de vegetação.

## Identificação das Plantas Transgênicas

As plantas selecionadas em casa de vegetação com herbicida PPT foram testadas quanto à inserção dos genes de interesse utilizando um primer direto e reverso no promotor da Ubiquitina, no caso do controle, e o primer direto na Ubiquitina com um reverso no *OsPSTOL1*, no caso da construção com o gene. Todas as plantas geradas e selecionadas com PPT apresentaram PCR positivo para a presença do gene *BAR* (Tabela 1 e Figura 3), indicando que o método de seleção foi eficiente. Esse resultado é importante pois confere confiabilidade aos resultados já que culturas transgênicas

dependem da utilização de um gene de resistência, antibiótico ou herbicida, para confirmação dos transgenes (BAJAJ; MOHANTY, 2005). Já para a presença do inserto (Tabela 1 e Figura 3), foram observadas cinco plantas positivas das quatorze plantas avaliadas para *OsPSTOL1*. A inserção do gene *BAR*, mas não do gene *OsPSTOL1*, pode ser explicada pela deleção do gene específico durante o processo de transformação (SHA et al., 2004). Esse evento é pouco frequente, uma vez que o gene específico foi clonado junto à borda direita do T-DNA, e a amplificação de junções do T-DNA da borda direita tende a permanecer sem deleções com localização de todos os sítios internos de clivagem (YANG et al., 2013).

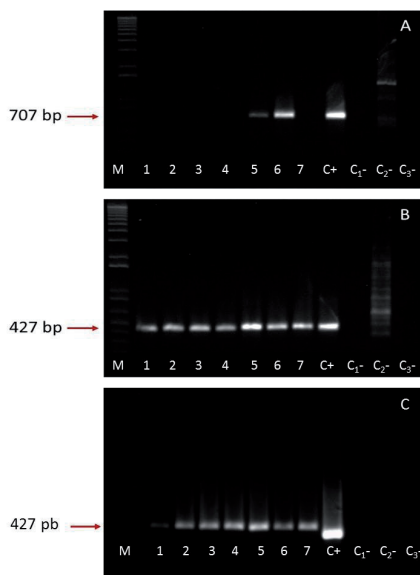
**Tabela 1.** Total de eventos transgênicos confirmados por PCR.

Construções	Total de eventos	Positivos <i>Bar</i>	Positivos <i>OsPSTOL1</i>
pMCG1005 (Vetor vazio)	14	14	-
UBI:: <i>OsPSTOL1</i> ::NOS	7	7	5

## Número de Cópias do Transgene por PCR em Tempo Real

O número de cópias do transgene foi calculado pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , com base no gene *BAR*, comparando as amostras com o DNA de uma amostra já confirmada por testes moleculares e teste de segregação (LOPES, 2016). Foi feito o teste com o tabaco não transformado, com os sete eventos do pMCG1005 e os cinco eventos do *OsPSTOL1*. Apenas dois eventos, um do grupo controle (pMCG1005 Ev. 5) e outro do gene específico (*OsPSTOL1* Ev. 11), apresentaram mais de uma cópia (Tabela 2). Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *BAR*. Ingham et al. (2001) avaliaram 289 plantas de milho transformadas por *Agrobacterium* e

obtiveram 70% de eventos cópia única, 21% dos eventos com duas cópias e os demais eventos com mais de duas cópias, demonstrando a eficácia da inserção de uma cópia pelo método via *Agrobacterium* quando comparado ao método via biobalística. Resultados similares foram encontrados em milho, quando analisado o número de cópias de eventos gerados pelos dois métodos de transformação, sendo observados eventos cópia única para *A. tumefaciens* e eventos com mais de quatro inserções para biobalística (BARROS et al., 2011).



**Figura 3.** Análise de inserção do gene *OsPSTOL1* (A) e *BAR* (B e C) por PCR nas plantas de tabaco transformadas e regeneradas com as construções UBI::*OsPSTOL1*::NOS (A - *OsPSTOL1* e B - *BAR*) e com pMCG1005 (Vetor vazio) (C). M - 1 kb Plus Ladder (Invitrogen), 1 a 7 - Plantas regeneradas da transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, C+: Controle positivo (plasmídeo), C<sub>1</sub>-: Controle negativo: planta de milho selvagem, C<sub>2</sub>-: Controle negativo: planta de tabaco selvagem e C<sub>3</sub>-: Controle negativo: branco da reação (sem DNA). As setas indicam o tamanho do fragmento amplificado.

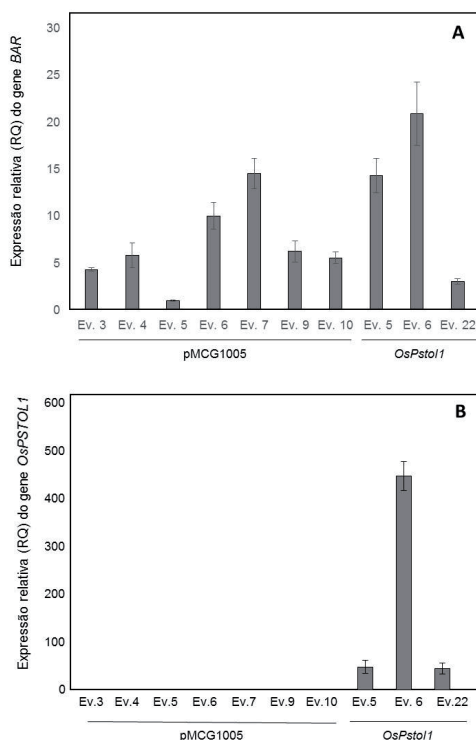
**Tabela 2.** Estimativa do número de cópias do transgene por qPCR calculada pelo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  em linhagens T0 de tabaco.

Amostras	Nº de cópias ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
Tabaco não transgênico	0
pMCG1005 Ev. 3	0,52
pMCG1005 Ev. 4	0,98
pMCG1005 Ev. 5	2,7
pMCG1005 Ev. 6	0,5
pMCG1005 Ev. 7	1,12
pMCG1005 Ev. 9	0,39
pMCG1005 Ev. 10	0,45
<i>OsPstol1</i> Ev. 5	0,79
<i>OsPstol1</i> Ev. 6	1,17
<i>OsPstol1</i> Ev. 11	1,72
<i>OsPstol1</i> Ev. 21	0,80
<i>OsPstol1</i> Ev. 22	0,80

### Expressão Relativa dos Genes *BAR* e *OsPSTOL1*

Foi realizado um ensaio de expressão com gene *BAR* e *OsPSTOL1* com os eventos transgênicos de tabaco. A expressão do gene *BAR* foi variável entre eventos individuais e também entre as duas construções (Figura 4A). Os três eventos *OsPSTOL1* apresentaram expressão do transgene, sendo que o evento 6 apresentou maior expressão. Os eventos controles (pMCG1005) não apresentaram expressão do gene *OsPSTOL1*, como esperado. Os eventos pMCG1005 Ev. 4 e *OsPSTOL1* Ev. 6, apesar de apresentarem estimativa de número de cópias igual ou próximo de um, não apresentaram níveis de expressão semelhantes entre si ou entre eventos da mesma construção com estimativa de número de cópias inferior a um. Não houve

correlação entre os níveis de expressão dos genes e o número de cópias do gene *BAR*. A variação de expressão pode ter sido afetada pelo local de integração no genoma, o que pode acontecer tanto nas transformações via *Agrobacterium* quanto via biobalística (GARRIDO et al., 2004; JOYCE et al., 2014).



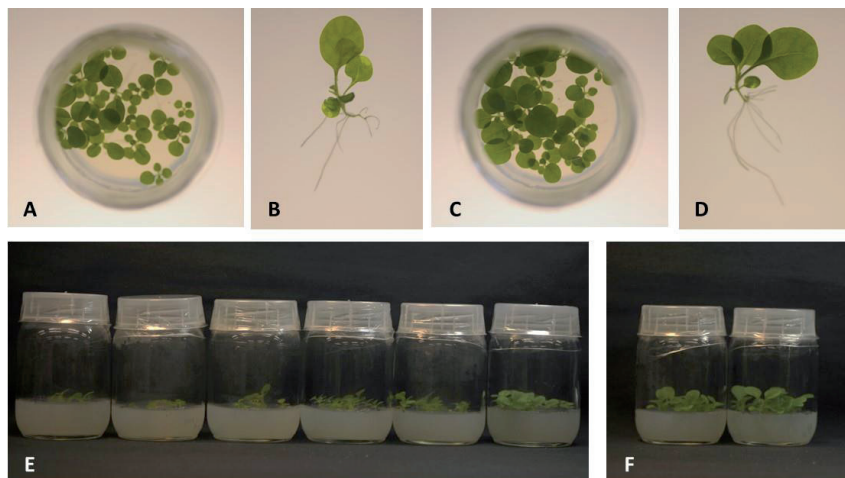
**Figura 4.** Expressão relativa (RQ) do gene marcador de seleção *Bar* (A) e *OsPSTOL1* (B) em eventos transgênicos de tabaco. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . As barras de erro correspondem a SEM de 3 repetições técnicas com 20 plântulas cada.

## **Caracterização Morfológica das Plantas Superexpressando *OsPstol1***

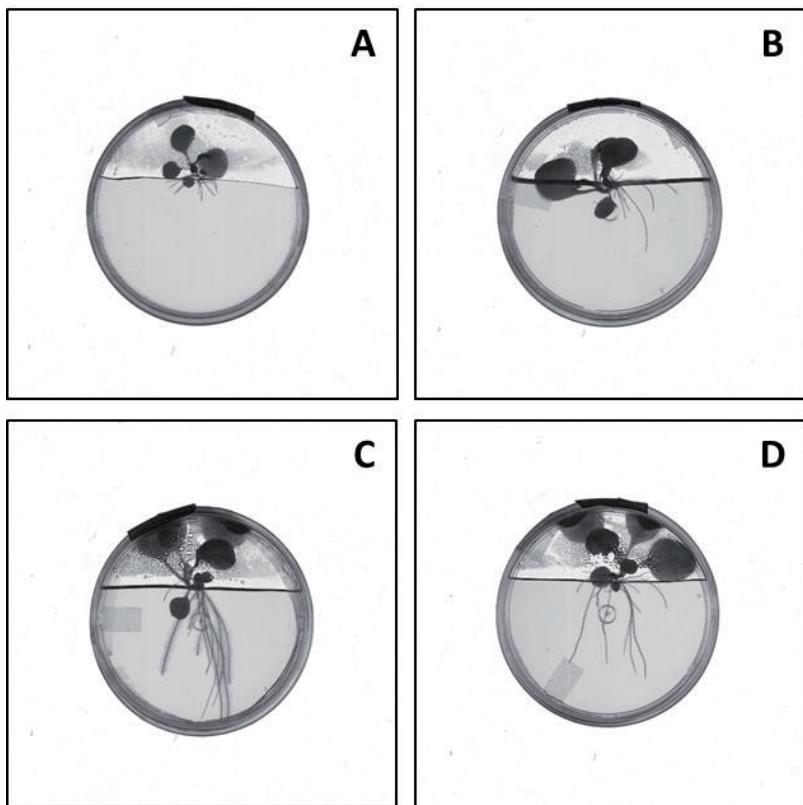
Para a análise morfológica, as plântulas de tabaco dos eventos transgênicos cópia única e com expressão gênica de média a alta foram crescidas em placas de Petri com meio de cultura sob baixo P, e o sistema radicular foi escaneado quando as plantas completaram 57 dias de tratamento, conforme determinado previamente por Lopes (2016). As raízes finas são componentes importantes no sistema radicular de grande parte das plantas anuais e perenes, constituindo a maior parte do sistema radicular total (PIERRET et al., 2005). Em milho mais de 56% do comprimento total da raiz decorrem de raízes menores que 0,175 mm e 35% em raízes menores que 0,125 mm de diâmetro, em medições por raio X (PALLANT et al., 1993), sendo essas raízes responsáveis por grande parte da absorção de P. Foi observado um maior crescimento vegetativo e do sistema radicular entre o controle e o *OsPSTOL1* (Figura 5 e 6). Foram medidos diversos parâmetros radiculares (SOUSA et al., 2012), incluindo comprimento radicular total (Figura 7A) e comprimento de raízes entre 0 e 0,5 mm (Figura 7B) e maior do que 0,5 mm (Figura 7C). Foi observada diferença significativa entre comprimento total e comprimento de raízes entre 0 e 0,5 mm entre os eventos controles (pMCG1005) e eventos *OsPSTOL1* e uma diferença menos consistente no comprimento de raízes maiores do que 0,5 mm (Figura 7). Raízes finas foram observadas em maior quantidade nas placas com os eventos *OsPSTOL1*, com destaque para o evento 6 (Figura 6E). Métodos de fenotipagem precisos, como os sistemas 2D e 3D e a tomografia computadorizada, permitem o estudo do sistema radicular durante o desenvolvimento da planta e as alterações causadas por estresses abióticos (TOPP et al., 2016). O *OsPSTOL1*, identificado em arroz, está relacionado



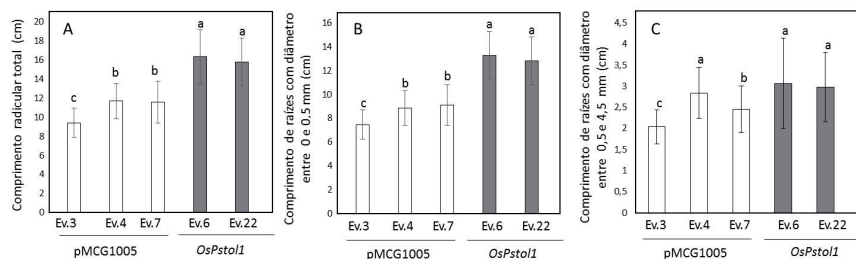
ao desenvolvimento precoce de raízes em condições de baixo P e à eficiência de aquisição P (GAMUYAO et al., 2012). Os resultados em tabaco corroboram o fenótipo observado nas plantas superexpressando o *OsPSTOL1* em arroz (GAMUYAO et al., 2012), sendo observado em ambos os casos um aumento do crescimento do comprimento radicular e da parte aérea.



**Figura 5.** Plântulas de tabaco crescidas em meio de cultura sob baixo P por 57 dias. A, B e E) Plântulas transformadas com o vetor vazio (pMCG1005); C, D e F) Plântulas transformadas com *OsPSTOL1*. A e C) Vista superior; B e D) Plântulas individuais; E e F) Vista lateral.



**Figura 6.** Plântulas de tabaco individuais crescidas em meio de cultura sob baixo P. A, B e C) pMCG1005 eventos 4 e 7, respectivamente. D, E e F) *OsPSTOL1* eventos 6 e 22, respectivamente.



**Figura 7.** Comprimento radicular total (A), de raízes com diâmetro em 0 e 0,5 mm (B) e maior do que 0,5 mm (C) (cm) de plântulas de tabaco transgênico crescidas em meio de cultura sob baixo P por 57 dias após a montagem dos experimentos. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média de seis repetições técnicas. As barras com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Student (LSD) ( $p < 0,05$ ).

Aumentar a produtividade em áreas de baixa fertilidade com sustentabilidade ambiental é um dos desafios contemporâneos (WEST et al., 2014). A produção alimentar precisa aumentar com o crescimento populacional, por isso há necessidade de uma maior produtividade sem aumentar a área plantada, reduzindo dessa maneira o impacto ambiental. Portanto, o melhoramento de plantas com práticas de manejo adequadas, aliadas a biotecnologia, tem um papel importante para a sociedade. Nesse trabalho foi demonstrado o potencial biotecnológico do *OsPSTOL1*, proveniente de uma variedade tradicional de arroz (GAMUYAO et al., 2012), para aumentar a aquisição de P através do aumento do sistema radicular em plantas dicotiledôneas, como o tabaco.

## Conclusão

Linhagens transgênicas de tabaco cópia única superexpressando o gene *OsPSTOL1* apresentaram maior comprimento radicular e maior crescimento vegetativo do que as plantas controles.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa (02.14.10.003.00.00) e à Fapemig (CBB-APQ-01515-14) pelo apoio financeiro.

## Referências

- BAJAJ, S.; MOHANTY, A. Recent advances in rice biotechnology: towards genetically superior transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, p. 275-307, 2005.
- BARROS, B. de A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. de P.; PÔSSA, K. F.; ANDRADE, L. C. S. S.; SILVA, V. L. da; LOPES, F. A.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; MAGALHAES, J. V. de. **Estimativa do número de inserções de transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 164).
- CHIN, J. H.; LU, X.; HAEFELE, S. M.; GAMUYAO, R.; ISMAIL, A.; WISSUWA, M.; HEUER, S. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL *Phosphorus uptake 1*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 120, p. 1073-1086, 2010.

FAGERIA, N. K. Efeito da calagem na produção de arroz, feijão, milho e soja em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 11, p. 1419-1424, nov. 2001.

GALLOIS, P.; MARINHO, P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco. In: JONES, H. (Ed.). **Plant gene transfer and expression protocols**. Totowa: Humana, 1995. p. 39-48. (Methods in molecular biology, 49).

GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; LOEDIN, I. S.; MENDOZA, E. M. T.; WISSUWA, M.; HEUR, S. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, Washington, v. 488, p. 535-541, 2012.

GARRIDO, H. S.; TRAVELLA, S.; BILHAM, L. J.; HARWOOD, W. A.; SNAPE, J. W. The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping. **Genetics**, Austin, v. 167, p. 1371-1379, 2004.

HEUER, S.; LU, X.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P.; KANAMORI, H.; MATSUMOTO, T.; DE LEON, T.; ULAT, V. J.; ISMAIL, A. M.; YANO, M.; WISSUWA, M. Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (*Pup1*) reveal a complex genetic structure. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, p. 456-471, 2009.

HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, p. 129-130, 1986.

INGHAM, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. **Biotechniques**, Natick, v. 31, p. 132-141, 2001.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 12, p. 411-424, 2014.

LIN, J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, Limerick, v. 109, p. 171-177, 1995.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ddCt. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, S. S. **Análise funcional do gene *pstol1* de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas.

LYNCH, J. P. Roots of the second Green Revolution. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 55, p. 493-512, 2007.

LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. New roots for agriculture: exploiting the root phenome. **Philosophical Transaction**, London, v. 367, p. 1598-1604, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NIU, Y. F.; CHAI, R. S.; JIN, G. L.; WANG, H.; TANG, C. X.; ZHANG, Y. S. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 112, p. 391-408, 2012.

NI, J. J.; WU, P.; SENADHIRA, D.; HUANG, N. Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1361-1369, 1998.

PALLANT, E.; HOLMGREN, R. A.; SCHULER, G. E.; MCCracken, K. L.; DRBAL, B. Using a fine root extraction device to quantify small diameter corn roots ( $\geq 0.025$  mm) in field soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 153, p. 273-279, 1993.

PARENTONI, S. N.; SOUZA JÚNIOR, C. L. de. Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 7, p. 893-901, 2008.

PIERRET, A.; MORAN, C. J.; DOUSSAN, C. Conventional detection methodology is limiting our ability to understand the roles and functions of fine roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 166, p. 967-980, 2005.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transport and signaling. **Plant Biology**, Stuttgart, v 3, p. 182-187, 2000.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 117, p. 169-176, 2010.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribossomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings, of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 2001. v. 1.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do bioma cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 1, p. 153-156, 2008.

SANTOS, M. A.; BARBIERI, A. F.; CARVALHO, J. A. M.; MACHADO, C. J. **O cerrado brasileiro**: notas para estudo. Belo Horizonte: UFMG: Cedeplar, 2010. Disponível em: <<http://cedeplar.face.ufmg.br/pesquisas/td/TD%20387.pdf>> Acesso em: 29 abr. 2016.

SHA, Y.; LI, S.; PEI, Z.; LUO, L.; TIAN, Y.; HE, C. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 306-314, 2004.



SOUSA, S. M.; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, p. 925-935, 2012.

ŠUBR, Z.; NOVAKOVA, S.; DRAHOVSKÁ, H. Detection of transgene copy number by analysis of the T1 generation of tobacco plants with introduced P3 gene of potato virus A. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 50, p. 135-138, 2006.

TENG, W.; DENG, Y.; CHEN, X. P.; XU, X. F.; CHEN, R. Y.; LV, Y.; ZHAO, Y. Y.; ZHAO, X. Q.; HE, X.; LI, B.; TONG, Y. P.; ZHANG, F. S.; LI, Z. S. Characterization of root response to phosphorus supply from morphology to gene analysis in field-grown wheat. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 5, p. 1403-1411, 2013.

TOPP, C. N.; BRAY, A. L.; ELLIS, N. A.; LIU, Z. How can we harness quantitative genetic variation in crop root systems for agricultural improvement? **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, p. 213-225, 2016.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, p. 423-447, 2003.

VANCE, C. P.; CHIOU, T. J. Phosphorus focus editorial. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, n. 3, p. 987-988, 2011.

WEST, P. C.; GERBER, J. S.; ENGSTROM, P. M.; MUELLER, N. D.; BRAUMAN, K. A.; CARLSON, K. M.; CASSIDY, E. S.; JOHNSTON, M.; MACDONALD, G. K.; RAY, D. K.; SIEBERT, S. Leverage points for improving global food security and the environment. **Science**, Washington, v. 345, p. 325-328, 2014.

WISSUWA, M.; AE, N. Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 275-286, 2001.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 777-783, 1998.

WISSUWA, M.; WEGNER, J.; AE, N.; YANO, M. Substitution mapping of *Pup1*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, p. 890-897, 2002.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LIU, J. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing *Cry1Ie* gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 51, p. 125-134, 2015.

YANG, X.; LI, F.; ZHANG, X.; LIU, K.; WANG, Q.; ZHANG, J.; LIU, C.; ZHU, Z.; SHAN, G.; CHIN, C. K.; FANG, W. Integration and characterization of T-DNA insertion in upland cotton. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 49, n. 2, p. 51-57, 2013.

